

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

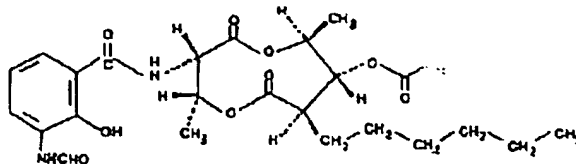
- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 07196485
 PUBLICATION DATE : 01-08-95
 APPLICATION DATE : 28-12-93
 APPLICATION NUMBER : 05338693

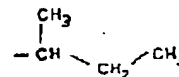


I

APPLICANT : KOBE STEEL LTD;

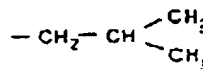
INVENTOR : NIWANO MITSURU;

INT.CL. : A61K 31/335 C07D321/00 // C12P
 17/08 (C12P 17/08 , C12R 1:465)



II

TITLE : SELECTIVE CYTOTOXIC AGENT
 AGAINST HUMAN TUMOR CELLS



III

TRACT : PURPOSE: To obtain a cytotoxic agent which comprises a specific antimycin and a medically permissible carrier, thus has high selective cytotoxicity against human tumor cells with side effects reduced.

CONSTITUTION: The cytotoxic agent comprises (A) antimycin A_{1a} of formula I (R is the group of formula II or formula III) or antimycin A_{1b} (R is the group of formula III) and (B) a medically permissible carrier. It is preferred that the dose of this cytotoxic agent is 0.01 to 4 mg/kg body weight, day in adult. The component A is produced by culturing a microorganism in Streptomyces.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-196489

(43) 公開日 平成7年(1995)8月1日

(51) Int.Cl.⁶

A 6 1 K 31/335

C 0 7 D 321/00

// C 1 2 P 17/08

(C 1 2 P 17/08

C 1 2 R 1:465)

識別記号

ADU

庁内整理番号

7432-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-338693

(22) 出願日 平成5年(1993)12月28日

(71) 出願人 000001199

株式会社神戸製鋼所

兵庫県神戸市中央区脇浜町1丁目3番18号

(72) 発明者 北浦 伸幸

茨城県つくば市観音台1丁目25番14号 株式会社神戸製鋼所筑波研究地区内

(72) 発明者 白田 勝利

茨城県つくば市観音台1丁目25番14号 株式会社神戸製鋼所筑波研究地区内

(72) 発明者 庭野 満

茨城県つくば市観音台1丁目25番14号 株式会社神戸製鋼所筑波研究地区内

(74) 代理人 弁理士 植木 久一

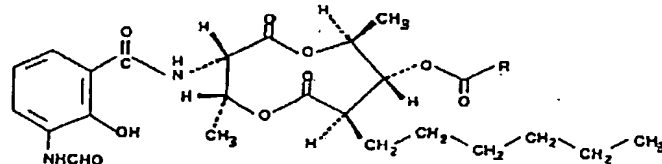
(54) 【発明の名称】 ヒト腫瘍細胞に対する選択的細胞障害剤

(57) 【要約】

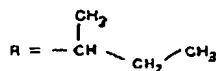
* 【構成】 下式

【目的】 ヒト腫瘍細胞に対して高い選択的細胞障害作用を有し、且つ副作用の少ない新規な薬剤を提供する。 *

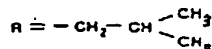
【化1】



アンチマイシン A_{1a}



アンチマイシン A_{1b}



で示されるアンチマイシン A_{1a} および/またはアンチマイシン A_{1b}、並びに医薬として許容される担体を含有す

ることを特徴とするヒト腫瘍細胞に対する選択細胞障害剤である。

(2)

特開平7-196489

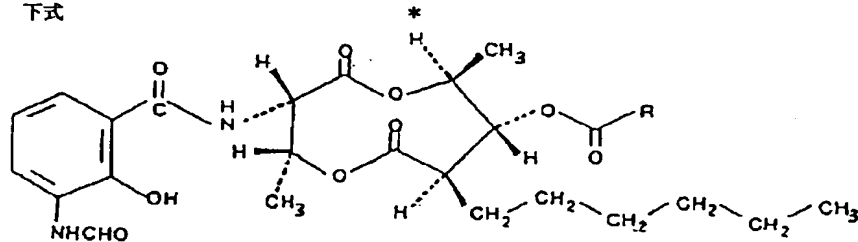
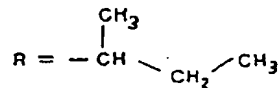
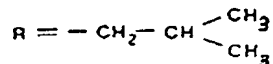
I

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下式

*【化1】

アンチマイシン A_{1a}アンチマイシン A_{1b}

で示されるアンチマイシンA_{1a}および/またはアンチマイシンA_{1b}、並びに医薬として許容される担体を含有することを特徴とするヒト腫瘍細胞に対する選択的細胞障害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ヒト腫瘍細胞に対して選択的に細胞障害作用を有する薬剤に関し、より詳しくはアンチマイシンA_{1a}および/またはアンチマイシンA_{1b}を有効成分として含有する選択的細胞障害剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】悪性腫瘍に対する化学療法剤としては、抗生物質（マイトマイシンC、ダクチノマイシン、アドリアマイシン等）、植物アルカロイド（ビンクリスチン等）、白金製剤（シスプラチン、カルボプラチン等）、プリン拮抗剤、ピリミジン拮抗剤、薬酸拮抗剤、アルキル化剤（シクロホスファミド、メルファラン、チオテバ

等）、ニトロソウレア誘導体（カルムスチン等）、ホルモン剤（クエン酸タモキシフェン等）などの多くの薬剤が開発されている。しかしながら、これらの薬剤の多くは、非特異的な細胞障害作用を示すものであり、ヒト腫瘍細胞に対する選択性が低い。従って、腫瘍細胞のみならず正常細胞に対しても同程度の細胞障害作用を示し、その結果、重篤な副作用を誘発するという問題がある。

【0003】

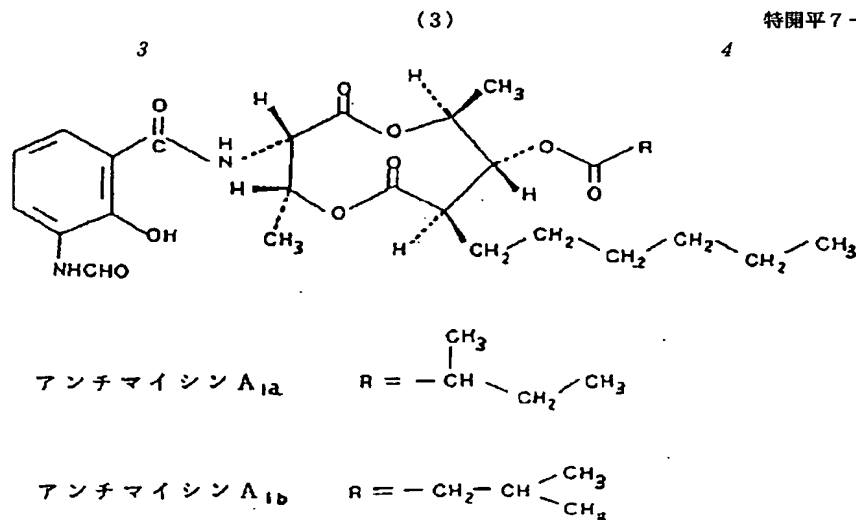
【発明が解決しようとする課題】本発明は以上のような問題に鑑みてなされたものであり、その目的は、従来の化学療法剤では達し得なかった様な、ヒト腫瘍細胞に対する高い選択的細胞障害作用を有し、かつ副作用の少ない薬剤を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明の選択的細胞障害剤は、下式

【0005】

【化2】



で示されるアンチマイシンA_{1a}および/またはアンチマイシンA_{1b}、並びに医薬として許容される担体を含有することに要旨を有するものである。

【0006】

【作用】本発明の薬剤の有効成分であるアンチマイシンA_{1a}およびアンチマイシンA_{1b}は、アンチマイシンAに含まれるアンチマイシンA₁を構成する化合物であり、その構造式は上式で表わされる。上記アンチマイシンAは、ストレプトマイセス属の放線菌の発酵液から抗カビ物質として分離された公知の物質 (Dunshee, B. R. 等, J. Am. Chem. Soc., Vol. 71, 2436 (1949)) であり、当初は、少なくとも4種の互いに類似した化合物、すなわちアンチマイシンA₁、アンチマイシンA₂、アンチマイシンA₃およびアンチマイシンA₄からなると考えられていたが、1987年にアンチマイシンA₁はアンチマイシンA_{1a}とアンチマイシンA_{1b}の混合物であること (Abidi, S.L. 等, Magn. Reson. Chem., Vol. 25, 1078 (1987))、さらに1988年には逆相HPLCによりアンチマイシンA₂はアンチマイシンA_{2a}とアンチマイシンA_{2b}に、アンチマイシンA₃はアンチマイシンA_{3a}とアンチマイシンA_{3b}に、アンチマイシンA₄はアンチマイシンA_{4a}とアンチマイシンA_{4b}とにそれぞれ分けられることが明らかになった (Abidi, S.L. 等, J. Chromatog., Vol. 447, 65 (1988))。

【0007】アンチマイシンAの作用としては、上記抗カビ作用の他に、殺虫作用および殺ダニ作用 (Kido, G. S. 等, Science, Vol. 112, 172 (1950))、魚毒性 (Derse, P.H. 等, Nature, Vol. 200, 600 (1963))、殺鼠作用 (Strong, F.M. 等, Topics in microbial chemistry, John Wiley and Sons, Inc., New York. (1958))、抗マラリア性 (Geary, T.G. 等, Am. J. Trop. Med. Hyg., Vol. 40, 240 (1989)) が知られている。また、細胞障害性に関しては、マウスL細胞 (Pestic. Biochem. Physiol., Vol. 10, 313 (1979)) に対する作用が知られてい

る。しかしながら、ヒト腫瘍細胞に対する細胞障害作用に関する知見は未だ得られていない。

【0008】本発明者らは、正常細胞に対する障害作用は低い、ヒト腫瘍細胞に対して選択的に強い障害作用を有する薬剤を求めて種々検索検討した結果、アンチマイシンA_{1a}およびアンチマイシンA_{1b}が、従来の化学療法剤に比べて低い濃度でもヒト固形ガン由来の腫瘍細胞に対して高い選択的細胞障害作用を有することを見出し、本発明を完成したのである。

【0009】本発明の有効成分であるアンチマイシンA_{1a}およびアンチマイシンA_{1b}の選択的細胞障害作用の作用機序については、まだ完全には解明されていないが、これらは、哺乳動物や昆虫では、正常細胞内のミトコンドリアにおける呼吸鎖の電子伝達系においてチトクロムbとチトクロムc₁の間を特異的に阻害し、更に一部の正常細胞では酵素によるアンチマイシンAの無毒化が明らかになっている。これに対し正常細胞が腫瘍化すると、アンチマイシンA_{1a}、A_{1b}の細胞膜透過性が亢進し、更に細胞内での代謝活性 (無毒化に関わる酵素活性) が弱まり、それらの結果アンチマイシンA_{1a}およびアンチマイシンA_{1b}がヒト腫瘍細胞内に選択的に取り込まれ、且つ無毒化されことなくその細胞障害作用を発揮するものと考えられる。

【0010】アンチマイシンA_{1a}およびアンチマイシンA_{1b}は、ストレプトマイセス属に属するいくつかの細菌種を用いて生産し、製造することができる (Strong, F.M. 等, Topics in microbial chemistry, John Wiley and Sons, Inc., New York. (1958))。

【0011】本発明の薬剤は、経口剤及び非経口剤のいずれの形態でも提供可能であり、投与経路や投与対象等に応じた最適の剤型を選ぶことができる。経口投与に適した剤型としては、錠剤、散剤、顆粒剤、軟・硬カプセル剤、舌下剤、各種液剤等が例示され、非経口に適した剤型としては、水溶性懸濁液、油性製剤などの皮下、静

脈あるいは筋肉注射、点滴剤、固体状または懸濁粘稠状の坐薬等が非限定的に例示される。

【0012】本発明の薬剤の製剤化に当たっては、常法に従い、界面活性剤、賦形剤、滑沢剤、佐剤及び必要に応じて医薬的に許容し得る皮膜形成物質、コーティング助剤等の医薬として許容される担体を用いることができ、以下にその具体例を挙げる。

【0013】本発明の薬剤を経口投与するときの消化管内での崩壊・溶出を良好にするために、界面活性剤、たとえばツイーン60、ポリソルベート80で代表されるようなアルコール、エステル類、ポリエチレングリコール誘導体、ソルビタンの脂肪酸エステル類、硫酸化脂肪族アルコール類の1種あるいは2種以上を添加することができる。

【0014】また、賦形剤としては、例えばショ糖、乳糖、デンプン、結晶性セルロース、マンニット、軽質無水珪酸、アルミン酸マグネシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム、合成珪酸アルミニウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素カルシウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の1種または2種以上を組み合わせて添加することができる。

【0015】滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油等を1種または2種以上添加することができ、矯味剤及び矯臭剤として、食塩、サッカリン、ショ糖、マンニット、オレンジ油、カンゾウエキス、クエン酸、ブドウ糖、メントール、ユーカリ油、リンゴ酸などの甘味剤、香料、着色料、保存料等を含有させても良い。懸濁剤や浸潤剤の様な佐剤としては、例えば、ココナッツ油、オリーブ油、ゴマ油、落花生油、乳酸カルシウム、ペニバナ油、大豆リン脂質等を含有させることができる。

【0016】また皮膜形成物質としては、例えば酢酸フタル酸セルロース(CAP)、またアクリル酸系共重合体、二塩基酸モノエステル類等のポリビニル誘導体としてアクリル酸メチル・メタクリル酸共重合体、メタクリル酸メチル・メタクリル酸共重合体等が挙げられる。

【0017】また上記皮膜形成物質をコーティングするに際しては、通常使用されるコーティング助剤、例えば可塑剤のほか、コーティング操作時の薬剤相互の付着防止のための各種添加剤を添加することによって皮膜形成剤の性質を改良したり、コーティング操作をより容易ならしめることができる。なお皮膜形成物質を用いて有効成分をマイクロカプセル化してから賦形剤等と混合した剤型としても良い。

【0018】本発明の薬剤の投与量は、症状の程度、患者の全身状態、年齢、体重等に応じて十分な細胞障害能

を発揮し得る量であり、腫瘍の種類や部位、更には進行の程度、投与経路や剤型等を考慮して適宜決定されるものであるが、有効成分であるアンチマイシンA₁およびアンチマイシンA_{1b}の量として、経口投与の場合、一般に大人では約0.01~4mg/kg/日の範囲であり、好ましくは約0.02~1mg/kg/日であり、小児では約0.01~2mg/kg/日の範囲であり、好ましくは約0.02~0.5mg/kg/日の範囲である。また非経口投与の場合、約0.001~0.5mg/kg/日の範囲であるが、好ましくは約0.002~0.1mg/kg/日の範囲である。

【0019】以下実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、下記実施例は本発明を制限するものではなく、前・後記の趣旨を逸脱しない範囲で変更実施することは全て本発明の技術的範囲に包含される。

【0020】

【実施例】

製剤例1：錠剤

常法に従って下記の組成で錠剤を作成した。

アンチマイシンA ₁	1mg
ゴマ油	20mg
乳糖	76mg
無水珪酸	100mg
ステアリン酸マグネシウム	3mg
全量	200mg

製剤例2：錠剤

常法に従って下記の組成で錠剤を作成した。

アンチマイシンA _{1b}	1mg
ゴマ油	20mg
乳糖	76mg
無水珪酸	100mg
ステアリン酸マグネシウム	3mg
全量	200mg

製剤例3：油性注射剤

アンチマイシンA ₁	1mg
ココナッツ油	449mg
全量	450mg

製剤例4：油性注射剤

アンチマイシンA _{1b}	1mg
ココナッツ油	449mg
全量	450mg

【0021】実験例1

ヒト固形ガン由来の腫瘍細胞およびヒト正常細胞に対する、アンチマイシンA₁およびアンチマイシンA_{1b}の細胞障害性試験を行った。本実験例に用いた細胞種およびその濃度は以下の通りである。

細胞種	濃度
正常細胞：ヒト胎児肺細胞 (IMR-90細胞)	2×10 ⁵ cells/ml
腫瘍細胞：ヒト肺ガン細胞 (A-549細胞)	5×10 ⁵ cells/ml
ヒト乳ガン細胞 (ZR-75-1細胞)	5×10 ⁵ cells/ml

ヒト膀胱ガン細胞 (MIA PaCa-2細胞) 5×10^5 cells/ml

また、本実験例に用いた選択的細胞障害剤（以下、薬剤と略記する）は以下の通りである（使用濃度は表1に記載）。

本発明例：アンチマイシンA₁。

アンチマイシンA_{1b}。

比較例：アドリアマイシン

マイトマイシンC

【0022】ギブコ製ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）に、10%の牛胎児血清、ストレプトマイシン 100mg/LおよびペニシリンG 100,000単位/Lを加えた培地（以下、培地と略記する）に、96ウェルのマイクロプレートを使用し各ウェルに上記の所定濃度の各細胞を接種し、5%CO₂、95%空气中、37℃で24時間培養後、培地を取り除いて、上記の薬剤を添加した新鮮な培地と交換し、さらに24時間培養した。なお、コントロールとして、薬剤を添加せずに上記の方法と同様にして培養したものを用意した。

【0023】各薬剤の細胞障害能は、細胞のニュートラルレッドの取り込みを測定して、コントロールと比較す*20

*ることにより評価した。すなわち、培養終了後、培地を取り除き、ニュートラルレッド50mg/Lを含む血清無添加のDMEMを加えた。DMEM添加後3時間目にこの培地を取り除き、細胞内に取り込まれたニュートラルレッドを、50%エタノール-1%酢酸（100μl/ウェル）で細胞外に抽出し、540nmにおける吸光度を測定した。

【0024】各薬剤の細胞障害作用は、正常細胞の場合は、コントロールとして薬剤無添加の正常細胞のニュートラルレッドの取り込み量を100としたときの、薬剤を用いた場合の正常細胞のニュートラルレッドの取り込み量の割合（生存率%）で表し、一方、腫瘍細胞の場合は、コントロールとして薬剤無添加の腫瘍細胞のニュートラルレッドの取り込み量を100としたときの、薬剤を用いた場合の腫瘍細胞のニュートラルレッドの取り込み量の割合（生存率%）で表した。その結果を表1に併記する。

【0025】

【表1】

	被験物質	濃度 (μg/ml)	細胞障害性			
			正常細胞	腫瘍細胞		
			IMR-90	A-549	ZR-75-1	MIA-PaCa-2
本発明例	アンチマイシンA ₁ 。	0.1	97	2	57	5
		0.01	103	107	106	101
		0.001	102	107	108	102
	アンチマイシンA _{1b} 。	0.1	101	2	61	7
		0.01	103	78	82	43
		0.001	105	106	107	105
比較例	アドリアマイシン	100	14	34	1	11
		10	82	44	73	4
		1	95	85	84	56
	マイトマイシンC	100	49	15	1	1
		10	68	39	61	6
		1	99	69	95	104

【0026】表1から明らかな様に、本発明例のアンチマイシンA₁およびアンチマイシンA_{1b}は、いずれもヒト固形ガン由来の腫瘍細胞に対して0.1μg/mLという極めて低い濃度で強い細胞障害作用を発揮し、且つこの濃度ではヒト正常細胞に対する細胞障害作用は全く見られなかった。従って、両者はいずれもヒト腫瘍細胞に対して高い選択的細胞障害作用を有していることが分かる。

【0027】これに対して、比較例のアドリアマイシンおよびマイトマイシンCは、いずれも10または100μg/mLという本発明例に比べて高い濃度の場合にお

いて初めて、腫瘍細胞に対する細胞障害作用を発揮したが、この濃度ではヒト正常細胞に対してもほぼ同程度の障害作用を示した。従って、従来の化学療法剤であるアドリアマイシンやマイトマイシンCはヒト腫瘍細胞に対する選択的細胞障害作用が低いことが分かる。

【0028】

【発明の効果】本発明は以上の様に構成されているので、従来の化学療法剤に比べて低い濃度でも、ヒト腫瘍細胞に対して高い選択的細胞障害作用を有し、且つ副作用も少ないという、非常に優れた薬剤を提供することができる。

